

ZBYSZKO LUBIEWSKI, ANNA GANDECKA, KRZYSZTOF MIKOŁAJCZAK,
GRAŻYNA LEWANDOWICZ

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

ZAGOSPODAROWANIE ODPADOWYCH TŁUSZCZÓW ZWIERZĘCYCH METODAMI ENZYMATYCZNYMI

Streszczenie. Celem pracy była optymalizacja oczyszczania odpadowych tłuszczów zwierzęcych z użyciem metod enzymatycznych w celu ich przystosowania do produkcji paliwa używanego w silnikach wysokoprężnych. Materiał badawczy stanowiły odpadowe tłuszcze zwierzęce – sadło wieprzowe oraz łój wołowy. W planowaniu optymalizacji zastosowano centralny plan kompozycyjny wykorzystujący współczynnik alfa ortogonalności. Do wszystkich eksperymentów użyto enzymu proteolitycznego Alcalase 2,4L. Badano wpływ trzech wielkości wejściowych: czasu reakcji, wytrząsania oraz dawki enzymu. Proces optymalizowano w kierunku maksymalizacji ilości uzyskiwanego tłuszczu. Wykazano, iż w przypadku obu substratów zastosowany model doświadczalny okazał się odpowiedni i pozwalał na osiągnięcie wysokiej wydajności reakcji, rzędu 95-100%. Na tej podstawie można wnioskować, iż hydroliza enzymatyczna za pomocą proteolitycznego preparatu enzymatycznego Alcalase 2,4L jest efektywną metodą przygotowania odpadowych tłuszczów zwierzęcych do procesu transestryfikacji, będącego głównym etapem produkcji biodiesla.

Słowa kluczowe: łój, sadło, tłuszcze odpadowe, biodiesel

Wstęp

Obecnie, w dobie coraz większej popularności diet niskotłuszczowych i propagowania zasad zdrowego żywienia, zmierza się do zminimalizowania wykorzystania tłuszczów zwierzęcych w przemyśle spożywczym. Również przykłada się coraz większą wagę do jakości wykorzystywanych tłuszczów, a nasycone tłuszcze zwierzęce, takie jak łój wołowy i sadło wieprzowe, są używane niechętnie. Dużą część odpadowych tłuszczów zwierzęcych lub tłuszczów niewykorzystanych w przemyśle spożywczym przejmuje przemysł chemiczny, m.in. do produkcji mydła (DA CUNHA i IN. 2009), część wykorzystywana jest w żywieniu zwierząt (PIKUL 1996), jednak możliwości przetwórcze

tych gałęzi przemysłu są ograniczone i istotnym problemem staje się znalezienie stałego, pewnego odbiorcy tego typu produktów. Rozwiązaniem może być rosnące zainteresowanie wytwarzaniem biopaliw z surowców odnawialnych, a w szczególności produkcją biodiesla – estrów alkilowych kwasów tłuszczowych (VASUDEVAN i BRIGGS 2008). Do produkcji tego rodzaju biopaliwa można z powodzeniem wykorzystać odpadowe tłuszcze zwierzęce, takie jak łój wołowy oraz sadło wieprzowe (ÖNER i ALTUN 2009). Biodiesel używany jako biopaliwo w silnikach wysokoprężnych ma wiele zalet, do których należy zaliczyć przede wszystkim jego odnawialność, biodegradowalność, nie wymaga również specjalnego przystosowywania silników, a jego spalanie, zarówno w czystej formie, jak i jako dodatku do ropy naftowej, powoduje znaczne zmniejszenie emisji dwutlenku węgla do atmosfery (HSU i IN. 2004, DEMIRBAS 2009). Produkcja biodiesla wymaga jednak dostarczenia surowca tłuszczowego stosunkowo czystego, niezawierającego wody, białka ani wolnych kwasów tłuszczowych, stąd konieczna jest jego wstępna obróbka (DIAZ-FELIX i IN. 2009).

Celem pracy była optymalizacja oczyszczania tłuszczów zwierzęcych (łoju wołowego oraz sadła wieprzowego) metodami enzymatycznymi w celu uzyskania surowca odpowiedniego do produkcji biodiesla.

Material i metody

Materiał badawczy pochodzenia zwierzęcego – łój i sadło – został dostarczony przez Zakłady Mięsne Andrzej Bystry w Swarzędzu. Oba surowce poddano ujednoczeniu przez zmielenie w młynie koloidalnym KM100 (Młynkol).

Zastosowany enzym proteolityczny – Alcalase 2,4L – otrzymano dzięki uprzejmości firmy Novozymes.

Zawartość białka we wszystkich badanych próbach oznaczono metodą Kjeldahla zgodnie z normą PN-A-04018:1975/Az3:2002.

Zawartości wody oznaczono zgodnie z normą PN-ISO 1442:2000.

Zawartości tłuszczu oznaczono zgodnie z normą PN-ISO 1444:2000.

Zawartość popiołu oznaczono zgodnie z normą PN-ISO 936:2000.

Liczbę kwasową oznaczono zgodnie z normą PN-EN ISO 660:2005.

Lepkość badanych substratów zmierzono aparatem RheoStress I z użyciem sensora typu płytka/płytko.

Do wykonania planu eksperymentu i statystycznej obróbki wyników wykorzystano program Statistica (Statsoft).

W planowaniu eksperymentu użyto centralnego planu kompozycyjnego z wykorzystaniem współczynnika alfa ortogonalności. Badano wpływ trzech zmiennych zależnych: czasu oczyszczania, szybkości wytrząsania oraz dawki enzymu proteolitycznego. Wartości graniczne wielkości wejściowych ustalono na następującym poziomie:

- czas: 2-12 h,
- wytrząsanie: 100-350 rpm,
- dawka enzymu: 0,0096-0,036 AU/g białka.

Badaną wartością wyjściową (zmienną niezależną) była efektywność reakcji, definiowana jako procent odzyskanego tłuszczu, czyli masa tłuszczu uzyskanego po obróbce podzielona przez masę tłuszczu zawartego w próbce surowca przed obróbką.

Wszystkie eksperymenty optymalizacyjne prowadzono w temperaturze 60°C, enzym podawano stukrotnie rozcieńczony w 10 milimolowym buforze fosforanowym o pH 8. Po zakończeniu eksperymentów pozostawiano próbę w temperaturze 60°C do utworzenia wyraźnych warstw, następnie w drodze dekantacji oddzielano powstałą warstwę tłuszczową.

Wyniki i dyskusja

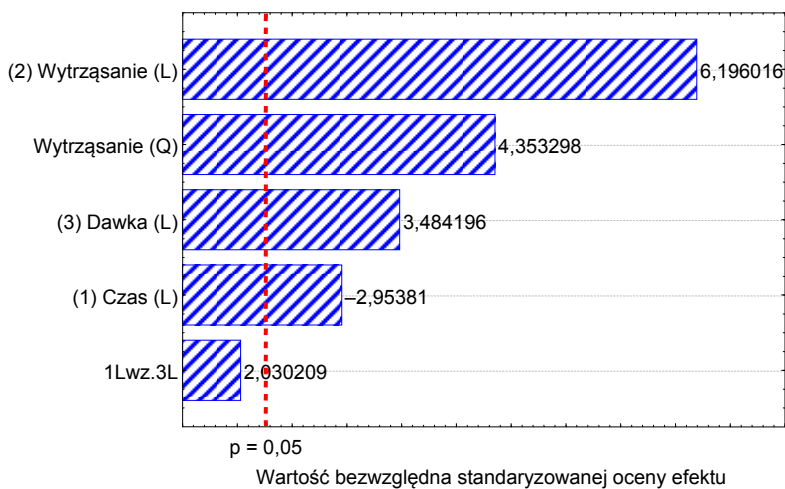
Badane surowce tłuszczowe poddawano wstępnemu ujednoczeniu w młynie koloidalnym a następnie analizowano ich właściwości fizykochemiczne. Badanie składu tłuszczów (tab. 1) wykazało, że zarówno łój, jak i sadło zawierają zbyt dużo wody oraz białka, aby mogły być bez dalszej obróbki wykorzystywane do produkcji biodiesla obecnie stosowanymi metodami przemysłowymi (w drodze transestryfikacji alkalicznej).

Tabela 1. Skład badanych surowców tłuszczowych (%)
Table 1. Composition of the investigated raw materials (%)

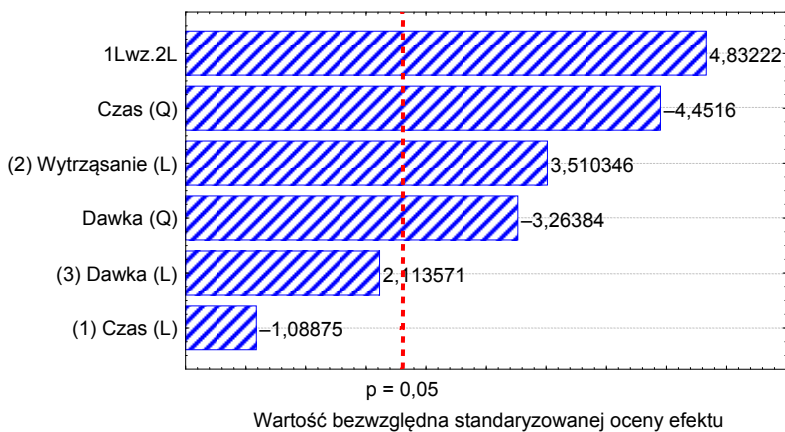
| Substrat | Zawartość tłuszczu | Zawartość wody | Zawartość białka |
|----------|--------------------|----------------|------------------|
| Łój | 92,16±0,77 | 6,56±0,50 | 1,29±0,33 |
| Sadło | 92,58±0,13 | 5,15±0,21 | 2,27±0,10 |

Przedstawione w tabeli wyniki wskazują, iż oba badane tłuszcze wymagają obróbki wstępnej w celu umożliwienia ich wykorzystania w reakcji transestryfikacji. W celu przybliżonego określenia warunków tego procesu przeprowadzono badania wstępne. Pozwoliły one na wytypowanie enzymu proteolitycznego Alcalase 2,4L jako efektywnego katalizatora procesu obróbki wstępnej. Określono też warunki brzegowe procesu, takie jak szybkość wytrząsania, czas reakcji oraz dawka enzymu, oraz stworzono plan eksperymentu, który na podstawie centralnego planu kompozycyjnego z wykorzystaniem współczynnika alfa ortogonalności umożliwiał zbadanie wpływu trzech wyżej wymienionych zmiennych zależnych. Dla każdego z badanych substratów przeprowadzono 16 eksperymentów optymalizacyjnych, które pozwoliły na określenie wpływu każdego z badanych czynników na efektywność reakcji wyrażoną jako procent odzyskanego tłuszczu.

W przypadku obu badanych substratów wszystkie analizowane zmienne wywierały statystycznie istotny wpływ na efektywność reakcji (rys. 1, 2). Jak widać na przedstawionych wykresach pareto, w przypadku łoju największy wpływ na efektywność reakcji miało wytrząsanie, mniejszy efekt wywierały zaś dawka enzymu oraz czas reakcji. W przypadku sadła najbardziej na ilość odzyskanego tłuszczu wpływał połączony efekt wytrząsania oraz czasu reakcji.



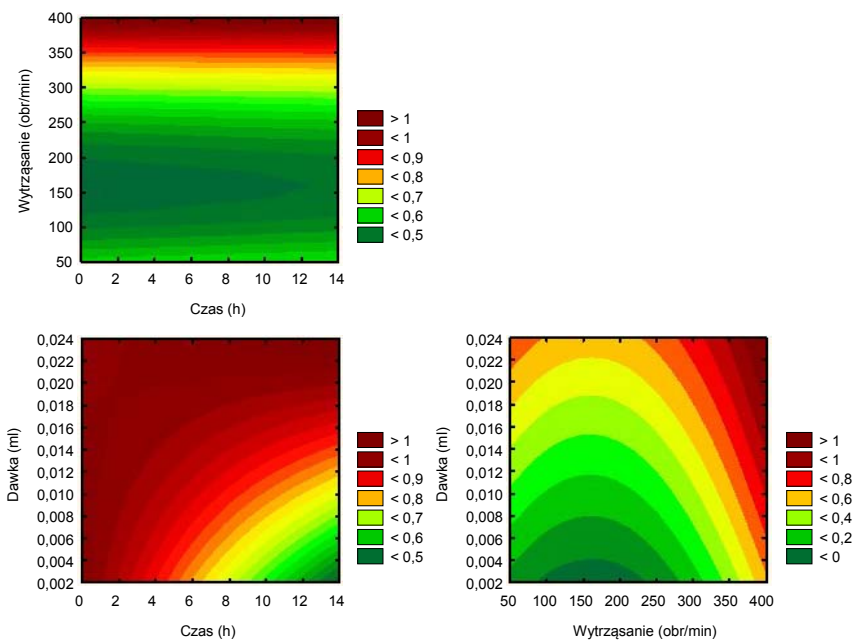
Rys. 1. Wykres pareto oceny efektów – łój
Fig. 1. Pareto chart of standardized effects – beef tallow



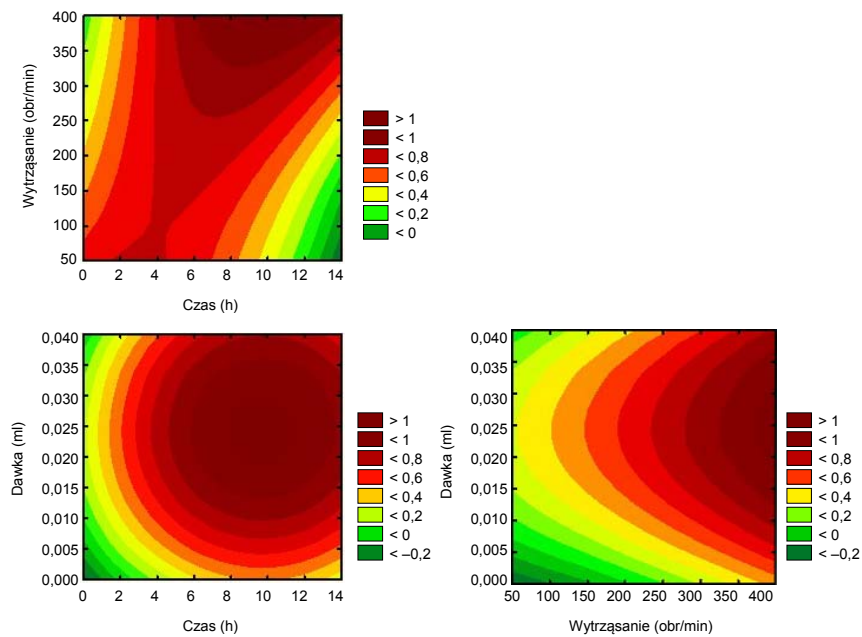
Rys. 2. Wykres pareto oceny efektów – sadło
Fig. 2. Pareto chart of standardized effects – pig fat

Dokładne wykreślenie warstw użyteczności (rys. 3, 4) pokazało, iż w przypadku łożu największą wydajność reakcji można uzyskać, stosując największe badane dawki enzymu, przy maksymalnym wytrząsaniu i najdłuższym czasie reakcji. Również w przypadku sadła wskazane jest maksymalne wytrząsanie, jednak zastosowanie maksymalnej dawki enzymu i maksymalnego czasu reakcji wpłynie już na nieznaczne pogorszenie efektywności reakcji oczyszczania.

Dzięki zastosowaniu modelu doświadczenia możliwe było wyznaczenie optymalnych warunków reakcji, które w przypadku łożu przedstawiały się następująco: czas



Rys. 3. Warstwy użyteczności – łój
Fig. 3. Desirability contours – beef tallow



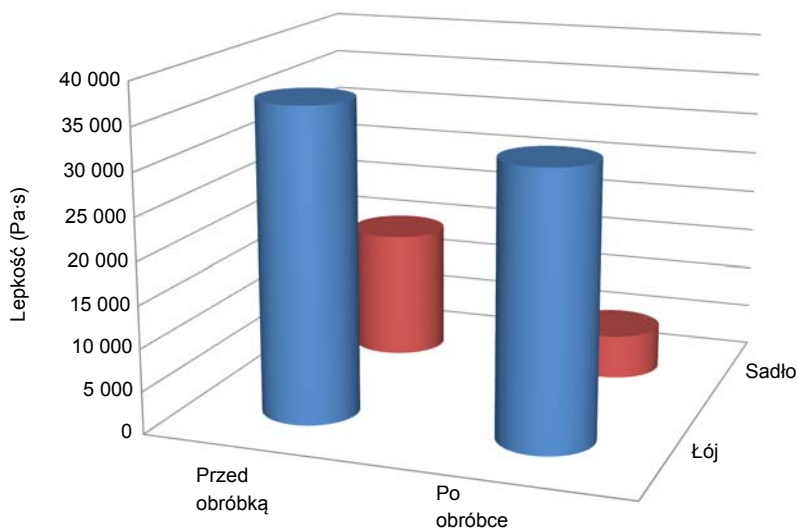
Rys. 4. Warstwy użyteczności – sadło
Fig. 4. Desirability contours – pig fat

reakcji 13,4 h, wytrząsanie 385 obr/min, dawka enzymu 0,00051 AU/g białka. W przypadku sadła zmienne te powinny mieć następujące wartości: czas reakcji 10,2 h, wytrząsanie 385 obr/min, dawka enzymu 0,00072 AU/g białka. W obu przypadkach zastosowanie wyżej wymienionych parametrów reakcji powinno pozwolić na przeprowadzenie reakcji enzymatycznego oczyszczania badanych surowców tłuszczowych z wydajnością przekraczającą 99%.

Poprawiony współczynnik R^2 dla planu optymalizacyjnego oczyszczania łój wyniósł 0,86365, co pozwala wnioskować, iż ponad 86% zmienności zostało w modelu uwzględnione. Podobną wartość poprawionego współczynnika R^2 uzyskano w przypadku modelu oczyszczania sadła (0,84297).

Aby sprawdzić wiarygodność stworzonego modelu, wykonano eksperymenty walidacyjne, zarówno w warunkach optymalnych dla każdego substratu, jak i dla środkowych wartości badanych zmiennych. We wszystkich przypadkach wyniki mieściły się w odpowiednich przedziałach ufności, co pozwala wnioskować, że założenia modelu są prawidłowe i dobrze opisuje on czynniki wpływające na efektywność wstępnego oczyszczania tłuszczów odpadowych w celu przystosowania ich do reakcji transestryfikacji.

W celu określenia przydatności przygotowanych surowców do przemysłowego wytwarzania biopaliwa przeznaczonego dla silników wysokoprężnych wykonano również pomiar liczby kwasowej. Wynosiła ona $1,77 \pm 0,05$ oraz $15,84 \pm 0,74$ odpowiednio dla łój i sadła. Przyjmuje się, iż w przypadku transestryfikacji alkalicznej największą dopuszczalną wartością liczby kwasowej jest 2 (DIAZ-FELIX i IN. 2009), stąd też można wnioskować, że łój po przedstawionej wyżej obróbce będzie się nadawał idealnie do tego typu reakcji. W przypadku sadła wartość ta jest przekroczona, nie eliminuje to jednak tego surowca jako substratu do produkcji biodiesla, gdyż możliwa jest również produkcja w systemie dwuetapowym, ze wstępną transestryfikacją kwasową, wykonywaną właśnie w przypadku surowców o dużej wartości liczby kwasowej. Obiecująca



Rys. 5. Lepkość badanych substratów przed obróbką i po niej
Fig. 5. Viscosity of investigated substrates before and after pretreatment

również może się wydawać transestryfikacja enzymatyczna, w której przypadku obecność wolnych kwasów tłuszczowych nie ma znaczenia.

W celu określenia właściwości fizycznych badanych tłuszczów dokonano pomiaru ich lepkości (rys. 5), zarówno przed obróbką enzymatyczną, jak i po niej. Można zaobserwować, że wstępne enzymatyczne przystosowanie tłuszczów do reakcji transestryfikacji w sposób wyraźny wpływa na obniżenie ich lepkości, co powinno spowodować umożliwienie efektywniejszego ich mieszania z substratem alkoholowym oraz penetrację tłuszczów przez katalizator tej reakcji.

Wnioski

1. Zarówno w przypadku sadła, jak i łoju niezbędna jest ich obróbka wstępna, przede wszystkim ze względu na zbyt dużą zawartość w nich białka i wody, jak również na zbyt dużą lepkość.

2. Wstępna obróbka obu surowców tłuszczowych z wykorzystaniem enzymu proteolitycznego Alcalase 2,4L umożliwia praktycznie całkowite oczyszczenie badanych substancji z białka i wody, przy jednoczesnym bardzo korzystnym zmniejszeniu ich lepkości.

3. Zastosowany plan eksperymentu pozwolił na zaprojektowanie modelu statystycznego, dzięki któremu można było wyznaczyć optymalne warunki prowadzenia oczyszczania wstępnego, które przedstawiały się następująco: dla łoju – czas reakcji 13,4 h, wytrząsanie 385 obr/min, dawka enzymu 0,00051 AU/g białka, dla sadła – czas reakcji 10,2 h, wytrząsanie 385 obr/min, dawka enzymu 0,00072 AU/g białka.

4. Ze względu na małą wartość liczby kwasowej przetworzony łój może zostać wykorzystany do produkcji biodiesla w reakcji alkalicznej transestryfikacji, sadło natomiast, ze względu na większą wartość liczby kwasowej, aby mogło być wykorzystywane do produkcji paliwa do silników wysokoprężnych, powinno być użyte w reakcji dwuetapowej ze wstępną transestryfikacją kwasową lub w jednoetapowej reakcji transestryfikacji enzymatycznej.

Literatura

- CUNHA M.E. DA, KRAUSE L.C., MORAES M.S., FACCINI C.S., JACQUES R.A., ALMEIDA S.R., RODRIGES M.R.A., CARAMAO E.B., 2009. Beef tallow biodiesel produced in a pilot scale. *Fuel Process. Technol.* 90: 570-575.
- DEMIRBAS A., 2009. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energ. Convers. Manage.* 50: 14-34.
- DIAZ-FELIX W., RILEY M.R., ZIMMT W., KAZZ M., 2009. Pretreatment of yellow grease for efficient production of fatty acid methyl esters. *Biomass Bioenerg.* 33: 558-563.
- HSU A.-F., JONES K.C., FOGLIA T.C., MARMER W.N., 2004. Continuous production of ethyl esters of grease using an immobilized lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81: 749-752.
- ÖNER C., ALTUN S., 2009. Biodiesel production from inedible animal tallow and an experimental investigation of its use as alternative fuel in a direct injection diesel engine. *Appl. Energ.* 86: 2114-2120.

- PIKUL J., 1996. Wpływ rodzaju i jakości tłuszczów oraz dodatku tokoferoli w paszach drobiowych na utlenianie lipidów mięsa drobiu podczas przetwarzania i przechowywania. *Post. Drobiar.* 34: 10-20.
- PN-A-04018:1975/Az3:2002 Produkty rolniczo-żywnościowe – Oznaczanie azotu metodą Kjeldahla i przeliczanie na białko.
- PN-EN ISO 660:2005 Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – oznaczanie liczby kwasowej i kwasowości.
- PN-ISO 936:2000 Mięso i przetwory mięsne – Oznaczanie popiołu całkowitego.
- PN-ISO 1442:2000 Mięso i przetwory mięsne – Oznaczanie zawartości wody (Metoda odwoławcza).
- PN-ISO 1444:2000 Mięso i przetwory mięsne – Oznaczanie zawartości tłuszczu wolnego.
- VASUDEVAN P.T., BRIGGS M., 2008. Biodiesel production – current state of the art and challenges. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 421-430.

ENZYMATIC TREATMENT OF NON-EDIBLE AND WASTE ANIMAL FATS

Summary. The aim of the work was to optimize the enzymatic purification of non-edible animal fats. The purification was conducted to adjust waste animal fats to biodiesel production. Beef tallow and pig fat were the experimental materials. Central Composite and Non-factorial Response Surface Designs with use of Alpha for Orthogonality Design was used for the optimization. Enzymatic preparation, Alcalase 2.4L, was used in all experiments. The influence of the factors like reaction time, shake ratio, and enzyme ratio on reaction efficiency was investigated. Reaction efficiency was defined as an amount of recovered fat. The research revealed that the experimental design used was appropriate for both substrates, as the satisfying level of reaction efficiency of 95-100% was possible to achieve. On the basis of the results, one can conclude that enzymatic pretreatment of non-edible animal fats using Alcalase 2.4L could be a satisfying method for adjusting waste animal fats to biodiesel production.

Key words: beef tallow, pig fat, non-edible grease, biodiesel

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Zbyszko Lubiewski, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań, Poland, e-mail: zbyszlub@up.poznan.pl

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:

29.09.2009

Do cytowania – For citation:

Lubiewski Z., Gandecka A., Mikołajczak K., Lewandowicz G., 2009. Zagospodarowanie odpadowych tłuszczów zwierzęcych metodami enzymatycznymi. *Nauka Przyr. Technol.* 3, 4, #121.